

ヒト膀胱癌由来培養細胞株, KK-47 に対する 抗癌剤と温熱の併用殺細胞効果

金沢大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 久住治男教授)

新田 政博, 久住 治男, 中嶋 和喜

COMBINED CELL KILLING EFFECTS OF ANTICANCER DRUGS AND HYPERTHERMIA *IN VITRO*

Masahiro NITTA, Haruo HISAZUMI and Kazuyoshi NAKAJIMA

From the Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University
(Director: Prof. H. Hisazumi)

Using an *in vitro* colony forming assay system, cytotoxic effects of anticancer drugs, adriamycin (ADM) and peplomycin (PEP), and the combined effect of hyperthermia and anticancer drugs on cultivated KK-47 cells were investigated. From the response curves obtained at 42 and 43°C hyperthermia, 20% growth inhibition time (IT20) at 42 and 43°C hyperthermia and 50% growth inhibition time (IT50) at 43°C were calculated. The IT 20 and IT 50 hyperthermia were combined with a 2-hour treatment of each of the anticancer drugs. When the hyperthermia was combined with various concentrations of ADM ranging from 0.005 to 0.1 µg/ml, enhanced cell killing effects were obtained at the concentrations of less than 0.02 µg/ml of ADM, whereas, there was no increase in cell killing effect at the concentrations of more than 0.05 µg/ml of ADM. The combination of hyperthermia with PEP considerably enhanced the cell killing effects with an increase of PEP concentration.

(Acta Urol. Jpn. 34: 1525-1528, 1988)

Key words: Anticancer drugs, Hyperthermia

緒 言

癌集学的治療法の一つとして、最近になり温熱療法が注目されている¹⁾。癌温熱療法においては温熱単独の抗腫瘍効果は比較的小さいとされ、従来より放射線療法との併用が基礎および臨床の両面より研究されてきた。しかし、放射線併用温熱療法は局所療法の一つである一方、悪性腫瘍は全身疾患で、特に温熱療法の対象となる癌患者には遠隔転移を有する場合も多く、化学療法などの全身療法との併用が考慮されるべきであろう。今回われわれは、従来より癌温熱療法と良好な併用効果を有すると報告されてきた adriamycin²⁾ (ADM) および peplomycin³⁾ (PEP) の 2 剤の殺細胞効果と、42°C もしくは 43°C 加温の併用による殺細胞効果をヒト膀胱癌由来培養細胞株 KK-47^{4,5)} を用い、コロニー形成法にて検討したのでその成績を報告する。

実験材料および実験方法

1. 培養細胞および培養方法

KK-47 細胞は 20% calf serum (Micro biological-Associates, Md, USA) と抗生物質として kanamycin sulfate 50 µg/ml を含有した 80% Ham F-12 培地 (日本製薬(株)東京) からなる FC-20 培養液を用い、37°C にて閉鎖培養したものを実験に供した。

2. 細胞の温熱感受性

温熱処理の方法は従来^{6,7)}と同様で、対数増殖期にある KK-47 細胞の単個細胞浮遊液を作成し、FC-20 を用いて 300 細胞/ml の細胞浮遊液に調整した。この細胞浮遊液を 5 ml ずつポリエチレン製短試験管に分注し、これらを 37, 42, および 43°C に温度設定した恒温水槽, Dx-80 (温度誤差 ± 0.08°C, 大洋科学工業 KK, 東京) に浸すことにより、加温を行った。経時的に試験管を取り出し、pipetting により細胞を遊離した後、Falcon 製 tissue culture dish 60 × 15

mm⁶,77 (culture dish) に 1 ml ずつ分注し, FC-20 を 4 ml ずつ加え, コロニー形成法によって細胞生残率を算定した. この細胞生残率曲線より, 42°C および 43°C において細胞生残率を20%もしくは50%低下させるために必要な加温時間を, それぞれ IT 20 (20% inhibition time) および IT50 として算出した.

3. 各種抗癌剤の殺細胞効果

KK-47 細胞を 300 細胞/ml の濃度に調整し, これを 5 ml ずつポリエチレン製短試験管に分注後, 各種濃度の抗癌剤を加え, 37°C で 2 時間恒温水槽に浸して薬剤接触を行った. 抗癌剤処理後は, 2,000 rpm で 3 分間遠心し上澄を除去し, FC-20, 5 ml にて再浮遊させ, コロニー形成法により細胞生残率を求めた.

4. 温熱および抗癌剤併用による殺細胞効果

37°C における抗癌剤処理群を対照として, 42°C における IT20, および 43°C における IT20 と IT-50 に相当する温熱を抗癌剤処理開始直後に付加した. 温熱処理後は 37°C 恒温槽に戻し, 抗癌剤処理時間の合計が 2 時間となるようにした.

成 績

1. 細胞の温熱感受性

種々の時間にわたり温熱処理された KK-47 細胞より得られた細胞生残率曲線は Fig. 1 に示すとおりで, 42°C と 43°C の間で著明な殺細胞効果の差が認められた. すなわち 43°C における温熱処理時間が 30, 60, 90 および 120 分の場合の細胞生残率はそれぞれ 69.3, 26.9, 12.9, および 6.2% であった. すなわち 43°C 温熱処理においては, 処理時間が 30 分を経過すると片対数グラフ上で直線的な細胞生残率の低下が認められた. 一方, 42°C 処理時の細胞生残率は温熱処理時間が 30, 60, 90 および 120 分の時, それぞれ 91.1, 68.7, 64.1 および 61.1% であり, 60 分以上の加温時間における細胞生残率の低下は緩徐となった. 以上の結果より, 42°C における IT20 は 41 分であり, 43°C における IT20 と IT50 はそれぞれ 22 分および 41 分となった (Fig. 1).

2. 細胞の各種抗癌剤に対する感受性

各種濃度の ADM および PEP 処理後の KK-47 細胞の生残率曲線をそれぞれ Fig. 2 および Fig. 3 に示す. これらの生残率曲線から, 各抗癌剤の 2 時間処理により細胞生残率を 20% もしくは 50% 抑制するために必要な抗癌剤濃度をそれぞれ ID 20 (20% inhibition dose) および ID50 として算出し, Table 1 に一括表示する.

3. 温熱および抗癌剤併用による殺細胞効果

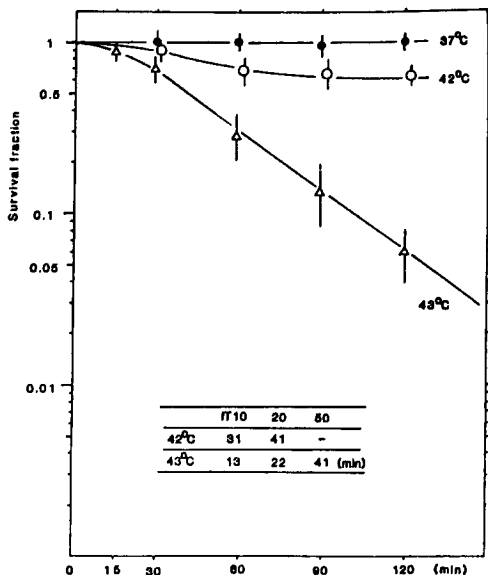


Fig. 1. Survival curves of KK-47 cells heated at 42 and 43°C for various lengths of time.

Table 1. ID20 and ID50 of KK-47 cells after a 2-hour drug exposure.

Drug	ID20	ID50 (ug/ml)
ADM	1.6×10^{-2}	4.1×10^{-2}
PEP	4.0×10^{-2}	1.9×10^{-1}

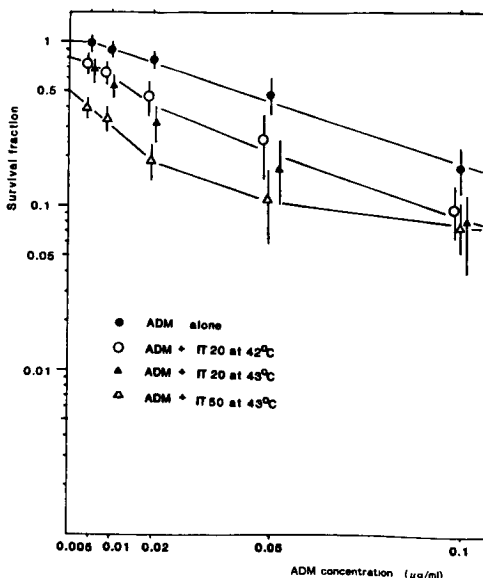


Fig. 2. Survival curves of KK-47 cells after the simultaneous treatment with ADM and hyperthermia (IT20 or IT50) at 42 or 43°C.

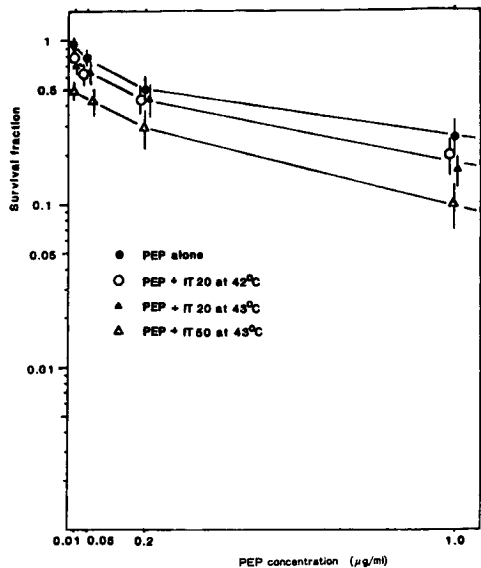


Fig. 3. Survival curves of KK-47 cells after the simultaneous treatment with PEP and hyperthermia (IT20 or IT50) at 42 or 43°C.

温熱および各種抗癌剤併用による細胞生存率曲線を Fig. 2 および Fig. 3 に示す。ADM においては温熱を付加することにより、抗癌剤濃度が 0.02 μg/ml 以下の場合には濃度に比例した殺細胞効果の増大が認められたが、抗癌剤濃度が 0.05 μg/ml 以上上昇すると抗癌剤単独群との殺細胞効果の差は減少した。

PEP 単独処理時には Fig. 3 に示すごとく、2～3 相性の上方に凹な細胞生存率曲線が得られた。また温熱の併用時には、細胞生存率曲線は軽度の傾き増加を伴う殺細胞効果の増大が認められた。

考 察

癌化学療法時の有効薬剤選択の方法には、isotope uptake を指標とする試験⁹⁾、tumor stemcell assay⁹⁾、subrenal capsule assay¹⁰⁾、nude mouse 移植癌を用いる *in vivo* 試験¹¹⁾ など多くの抗癌剤感受性試験方法が試みられ各々の試験方法について、その特徴が論ぜられてきた。われわれは KK-47 が 50～60% という比較的良好な plating efficiency を示すこと、一定した安定な発育を示すことなどコロニー形成法の必須条件を満たすことより、この方法を用いて各種抗癌剤に対する KK-47 細胞の感受性を検討した¹²⁾。

最近、癌集学的治療法の一つとして温熱療法が注目され、その治療成績が報告されるに至った^{13,14)}。われ

われも泌尿器癌に対し高周波による局所深部加温療法を試みてきた^{15,16)}。この温熱療法単独の治療成績には限界があることより、その効果増強を旨として放射線照射や抗癌剤を併用することは極めて重要なことと考えられる。しかし、温熱療法が主として放射線との併用療法の一つとして研究されてきたことも一因して、温熱併用化学療法に関する研究は比較的少ない¹⁷⁾。今回われわれは、臨床面で温熱療法と高頻度に併用され、その有用性が報告されてきた ADM, PEP の 2 剤につき、ヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 細胞を用いて、その薬剤感受性および温熱との併用殺細胞効果をコロニー形成法を用いて検討した。

その結果、ADM 単独では、濃度依存性に指数関数的な細胞生存率の低下が認められた。これに温熱を併用すると、ADM 濃度が 0.02 μg/ml 以下の場合には、濃度に比例した殺細胞効果の増大が認められたが、43°C の IT50 値の温熱の併用群においては、抗癌剤濃度の上昇とともに抗癌剤単独群との殺細胞効果の差は減少する傾向を示した。この所見は *in vitro* の実験系においては、温熱は ADM 感受性を増加させないという報告¹⁸⁾と矛盾しないもので、温熱療法と ADM との併用時には両者の処理順序、および間隔、薬剤濃度などについての検討が必要と思われた。

一方、PEP を用いた実験群においては、PEP 単独では細胞生存率曲線上、2～3 相性の上方に凹のカーブを示した。PEP は、bleomycin の誘導体であるが¹⁹⁾、この bleomycin における細胞生存率は Terasima ら²⁰⁾により詳細に研究されている。それによると bleomycin 処理後の細胞生存率曲線にみられる 2 相性はこの薬剤によって細胞に誘導される抵抗性に起因するものと説明されている。われわれの実験系では、PEP に温熱を併用することにより、細胞生存率曲線上の軽度の傾きの増大が認められ、その傾きの増大は PEP 濃度が高くなるほど著明となったことより、これは温熱による PEP 殺細胞効果の増大であり、従来の報告²¹⁾と矛盾しない所見と考えられた。以上、ADM および PEP の 2 剤につき、その薬剤感受性および温熱との併用殺細胞効果に関して検討したが、これらは *in vitro* での実験成績であり、これらの成績が必ずしも臨床で再現されるとは限らず、今後はさらに *in vivo* での種々の検討を加え、臨床に応用される必要があるものと考えられた。

結 語

ヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 を用い、*in vitro* における adriamycin および peplomycin の殺細胞

効果, 42°C もしくは 43°C 温熱の併用による殺細胞効果を検討し, 以下の結果を得た.

1. この細胞の生残率を20%もしくは50%阻止するために必要な加温時間を IT20, および IT50 とした場合に, 42°C IT20, 43°C IT20, および 43°C IT50 値はそれぞれ41, 22, 41分であった.

2. Adriamycin 単独では細胞生残率曲線上, 濃度依存性に細胞生残率の低下が認められ, 温熱を併用した場合には抗癌剤濃度が 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の場合には殺細胞効果の増大が認められたが, 抗癌剤濃度が0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の場合には, 抗癌剤単独群との殺細胞効果の差は減少した.

3. Peplomycin は細胞生残率曲線上, 上に凹の2~3相性のカーブを示し, 温熱の併用では細胞生残率曲線上での軽度の傾きの増大が認められた.

本論文の要旨は第11回制癌問題研究会(1986年11月22日, 金沢市)および第75回日本泌尿器科学会総会(1987年5月14日, 新潟市)で発表した。この研究の一部は文部省科学研究費補助金(課題番号58010035, 加納班), および厚生省がん研究助成金(課題番号59/5, 松田班)の補助を受けたもので, 付記して謝意を表する。

文 献

- 1) 柄川 順, 石岡邦明, 川田祥裕: 加温併用放射線療法の臨床. 癌と化学療法 **10**: 894-902, 1983
- 2) Hahn GM, Braun J and Kedar IH: Thermochemotherapy synergism between hyperthermia (42°-43°) and Adriamycin (or Bleomycin) in mammalian cell inactivation. Proc Nat Acad Sci USA **72**: 937-940, 1975
- 3) Braun J and Hahn GM: Enhanced cell killing by Bleomycin and 43° hyperthermia and the inhibition of recovery from potentially lethal damage. Cancer Res **35**: 2921-2927, 1975
- 4) 田谷 正, 小林徹治, 塚原健治, 打林忠雄, 内藤克輔, 久住治男, 黒田恭一: ヒト尿路悪性腫瘍の組織培養. 日泌尿会誌 **68**: 1003-1010, 1977
- 5) 久住治男, 鹿子木基二, 中嶋和喜, 小林徹治, 塚原健治, 内藤克輔, 黒田恭一, 松原藤継: ヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 の生物学的特性について. 日泌尿会誌 **70**: 485-494, 1979
- 6) 中嶋和喜: ヒト膀胱癌由来培養細胞(KK-47細胞)における温熱および放射線による殺細胞効果の研究. 日泌尿会誌 **71**: 363-377, 1980
- 7) Nakajima K and Hisazumi H: An experimental study of enhanced cell killing by hyperthermia and bleomycin. Urol Res **11**: 43-46, 1983
- 8) 花谷勇治, 久保田哲郎, 石引久弥, 阿部 令彦: ^3H thymidine (^3H TdR) uptake 阻害を指標とする in vitro 制癌剤感受性試験—in vivo との比較. 日癌治 **19**: 156, 1984
- 9) Hamburger AW and Salmon SE: Primary bioassay of human tumor stem cells. Science **197**: 461-463, 1977
- 10) Bogden AE, Kelton DE, Cobb WR and Esber HJ: A rapid screening method for testing chemotherapeutic agents against human tumor xenografts. In Houchens D.P. Ovejera A.A. eds. Proceedings of the Symposium on the Use of Athymic (Nude) Mice in Cancer Research. New York. Gustav Fischer Inc 231-250, 1978
- 11) 野宗義博: スードマウスを用いた制がん剤感受性試験と臨床効果. 日癌治 **19**: 171, 1984
- 12) 打林忠雄: ヒト膀胱癌由来培養細胞株 KK-47, KW-103, および Hela 細胞における各種抗癌剤の殺細胞効果について. 日泌尿会誌 **74**: 1606-1620, 1983
- 13) 菅原 努: ハイパーサーミアの現状と将来. 日放射線技士会誌 **30**: 11-23, 1983
- 14) 松田忠義, 杉山 彰, 中田吉則: RF 加温療法の研究(第1報). 日癌治 **18**: 1904-1914, 1983
- 15) 久住治男, 中嶋和喜: 泌尿器進行癌に対する 8MHz-RF 加温療法. 癌と化学療法 **13**: 1381-1386, 1986
- 16) 中嶋和喜, 久住治男, 山本 肇, 内藤克輔, 三崎俊光, 小橋一功, 横山 修, 斎藤泰雄: 手術不能の進行泌尿器悪性腫瘍に対する 8MHz-RF 加温療法の研究(第2報). 日泌尿会誌 **77**: 304-309, 1986
- 17) 石渡淳一, 佐々木常雄, 岩本昌平, 前田義治, 小池盛雄, 竹下祥敬, 田中良明, 松田忠義: 局所加温と化学療法. 癌と化学療法 **12**: 2114-2121, 1985
- 18) 加納永一, 古家雅代, 新田和美: 温熱と制がん剤の併用—特に制がん剤による温熱耐性出現の阻止の試み—. 癌と化学療法 **13**: 1377-1380, 1986
- 19) 犬山征夫: ベブレオマイシン. 癌と化学療法 **7**: 1498-1504, 1980
- 20) Terashima T, Takabe Y, Katsumata T, Watanabe M and Umezawa H: Effect of bleomycin on mammalian cell survival. J Natl Cancer Inst **49**: 1093-1100, 1972
- 21) 古家雅代: 制がん剤による温熱耐性細胞の温熱増感効果及び温熱耐性出現の阻止効果. 日本医放会誌 **46**(12): 1-10, 1986

(1987年10月19日受付)